

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00217

· 技术和方法 ·

## X-连锁肾上腺脑白质营养不良分子诊断中排除假基因干扰的一个新方法

柯龙凤<sup>1</sup>, 黄梁浒<sup>1</sup>, 王志红<sup>1</sup>, 谢海花<sup>1</sup>, 杨渤生<sup>2</sup>, 朱忠勇<sup>1</sup>, 兰风华<sup>1\*</sup>

1. 南京军区福州总医院遗传病分子诊断中心, 福州 350025

2. 南京军区福州总医院神经内科, 福州 350025

**[摘要]** **目的:**探讨 X-连锁肾上腺脑白质营养不良分子诊断中排除假基因干扰的新方法。**方法:**应用长链 RT-PCR 技术扩增 3 个 X-连锁肾上腺脑白质营养不良患者的 ABCD1 基因编码区全长,再分 4 个片段进行二次 PCR,并对 PCR 产物直接测序;应用巢式 PCR 对 ABCD1 基因相应区域进行扩增,其中第一轮 PCR 产物覆盖 ABCD1 基因从外显子 6 至 3'非编码区的一个大片段,并对 PCR 产物进行测序,分析患者的基因组 DNA,进一步确证其 ABCD1 基因突变。**结果:**在 3 个 X-ALD 患者的 ABCD1 基因上,存在 3 个不同的碱基改变(2235C>T,2065C>T 和 2190A>T),分别造成 2 个错义突变(R617C 和 P560L)和 1 个无义突变(K602X)。**结论:**应用巢式 PCR 能快速、有效地排除 X-ALD 分子诊断中 ABCD1 假基因的干扰。

**[关键词]** X-连锁肾上腺脑白质营养不良;ABCD1 基因;基因突变;假基因;分子诊断

**[中图分类号]** R 596.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0217-03

### A new method avoids interference of ABCD1 pseudogenes in molecular diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy

KE Long-feng<sup>1</sup>, HUANG Liang-hu<sup>1</sup>, WANG Zhi-hong<sup>1</sup>, XIE Hai-hua<sup>1</sup>, YANG Bo-sheng<sup>2</sup>, ZHU Zhong-yong<sup>1</sup>, LAN Feng-hua<sup>1\*</sup>

1. Center for Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China

2. Department of Neurology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025

**[ABSTRACT]** **Objective:** To introduce a new method which can avoid the interference of ABCD1 pseudogenes in the molecular diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **Methods:** The coding regions of ABCD1 gene of 3 unrelated Chinese patients with X-linked adrenoleukodystrophy were amplified from the total RNA of peripheral blood by long distance RT-PCR; the product was further amplified in 4 segments in a second round PCR; and the PCR products were purified and directly sequenced. To confirm the mutations, the genomic DNA from peripheral blood cells of the patients was analyzed by direct sequencing after amplification of the ABCD1 genes by nested PCR, in which the product of the first round PCR covered the fragment starting from exon 6 and ending at 3'UTR of the ABCD1 gene. **Results:** The 3 Chinese patients with X-linked adrenoleukodystrophy had 3 different base substitutions(2235C>T,2065C>T and 2190A>T)in the ABCD1 genes of the 3 probands and their mothers, which resulted in 2 missense mutations (R617C and P560L) and one nonsense mutation (K602X). **Conclusion:** Nested PCR can rapidly and efficiently avoid the interference of ABCD1 pseudogenes in the molecular diagnosis of X-ALD.

**[KEY WORDS]** X-linked adrenoleukodystrophy; ABCD1 gene; gene mutation; pseudogenes; molecular diagnosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2):217-219]

X-连锁肾上腺脑白质营养不良(X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD)是一种严重的致死性遗传病,主要侵犯脑白质、肾上腺等器官,临床上主要表现为听力、视力、智力及运动障碍等中枢神经系统病变的症状以及肾上腺皮质功能减退的症状。其疾病基因——ABCD1 基因定位于染色体 Xq28,编码 1 个含 745 个氨基酸残基的蛋白质,称为 ABCD1 蛋白。基于基因突变分析的分子诊断是 X-ALD 最为有效而准确的诊断方法,然而在人体基因组 DNA 中尚存在多个拷

贝的 ABCD1 假基因<sup>[1]</sup>,因此要准确检测 ABCD1 基因突变,需排除假基因的干扰。本研究以 3 个 X-ALD 家系的突变分析为例,探讨 X-ALD 分子诊断中排除假基因干扰的一个新方法。

### 1 资料和方法

1.1 临床资料 先证者 1,男,7 岁,以“双眼视力进行性下降 4 个月”为主诉就诊于福建省直机关医院,颅脑 MRI 检查

**[收稿日期]** 2008-07-16 **[接受日期]** 2008-09-01

**[基金项目]** 南京军区医药卫生“十一五”科研基金(06MA136), Supported by 11th Five-Year Health Foundation of PLA Nanjing Military Area Command(06MA136).

**[作者简介]** 柯龙凤,硕士,医师. E-mail:kelf2006@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0591-22859617, E-mail:fhlan005@163.com

示:双侧颞、枕、顶叶及桥脑、右侧桥臂异常信号灶,考虑肾上腺脑白质营养不良。

先证者2,男,8岁,以“视力下降6个月”为主诉就诊于北京协和医院,颅脑MRI检查示:双侧枕顶叶白质区对称性低T1、高T2信号,呈脱髓鞘改变,提示肾上腺脑白质营养不良。

先证者3,男,13岁,以“听力、学习成绩下降6个月”为主诉就诊于安徽医科大学附属第一医院,颅脑MRI检查示:双侧枕顶叶,胼胝体,两侧丘脑、桥脑长T1长T2异常信号灶,考虑肾上腺脑白质营养不良。

以上所有患儿的血浆极长链饱和脂肪酸(very long chain fatty acids, VLCFA)水平均升高(由武汉同济医院儿科代谢室检测),他们的父母均体健,否认近亲婚配史。

1.2 RT-PCR途径 以外周血总RNA为模板,对ABCD1基因编码区的全长进行长链RT-PCR<sup>[2]</sup>,继而分4段(P-I、P-II、P-III、P-IV)进行二次PCR<sup>[3]</sup>,其中每个片段的3'端和下一片段的5'端部分重叠。在二次PCR总反应体积50 μl中含:长链RT-PCR产物1 μl、引物各30 pmol、dNTP 0.2 mmol/L、*Taq* DNA聚合酶5U。P-I按下列条件扩增:94℃

预变性4 min后,94℃ 60 s;56℃ 60 s;72℃ 60 s;共30个循环。最后一个循环结束后继续在72℃延伸9 min。P-II、P-III、P-IV退火温度分别为58℃、55℃、55℃,其他扩增条件同P-I。PCR产物纯化后,以相应引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行DNA序列测定。

1.3 基因组DNA途径

1.3.1 引物设计 ABCD1假基因分别位于常染色体2p11、10p11、16p11和22q11区域,和ABCD1基因的第7外显子到第10外显子区域存在92%~96%的序列相似性<sup>[4]</sup>。为了彻底解决ABCD1假基因的干扰问题,本研究设计一对巢式PCR的外侧PCR引物,上游引物(P1876F):5'-TGG AGG AAG GCA TGC ATC TGC TCA TCA-3',下游引物(P2692R):5'-GGT GGG TGC TGC TGT CTC CTT CAT GTG-3',预期扩增长度为3 711 bp,扩增上至第6外显子,下至3'非编码区的一个大片段,如此只扩增X染色体上的基因,彻底避免了假基因扩增的干扰。再根据突变所在位置参考文献<sup>[5]</sup>设计4对内侧引物,分别扩增外显子7、8、9和10(表1),并委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表1 PCR引物、产物长度及退火温度

Tab 1 PCR primers, product length and annealing temperature

Position	Name of primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature t/℃	Product length(bp)
Exon 7	E7-F	TGG ATG CGT GTG AGC GTG G	55	358
	E7-R	GCA CCT GGC ACT TTA GAC TC		
Exon 8	E8-F	CGG GTC TGG GTG CTG GTG G	55	201
	E8-R	GCC TCC CCA CAG CTG CTA CT		
Exon 9	E9-F	TGG AGG GTG CAC AGA CTC TC	59	265
	E9-R	GCT GAT GAC AGC CGC CTG C		
Exon 10	E10-F	GTG CCG TGC CCC TGA CC	59	349
	E10-R	TGG GTG CTG CTG TCT CCT T		

1.3.2 巢式PCR 应用碘化钾法提取3个X-ALD家系相应成员的外周血基因组DNA,合成外侧PCR引物,扩增ABCD1基因片段(从外显子6至3'非编码区)。PCR总反应体积25 μl中,含基因组DNA 100 ng,引物各15 pmol、4种dNTP各0.2 mmol/L、*LA-Taq* DNA聚合酶5U(TaKaRa公司)。94℃预变性4 min后,按下列参数:94℃ 30 s,70℃ 4.5 min,共30个循环,最后72℃延伸5 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳后,在Fluor-S成像系统上成像。继而以第一轮PCR产物为模板,根据突变所在的外显子位置,采用相应的内侧引物,进行2次PCR扩增,PCR总反应体积50 μl中,含第一轮PCR产物1 μl,引物各30 pmol,4种dNTP各0.4 mmol/L,*r-Taq* DNA聚合酶5U(TaKaRa公司)。94℃预变性4 min后,按下列参数:94℃ 30 s,55~59℃ 30 s,72℃ 30 s,共30个循环,最后72℃延伸5 min。PCR产物纯化后,以相应引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行DNA序列测定。

2 结果

2.1 ABCD1基因突变的检出 分别对先证者及其母亲和无关对照的cDNA的PCR产物进行正反向测序(共测序3

次)。结果显示:先证者1的ABCD1基因第617位(位于外显子8)发生了CGC→TGC改变,使原来编码的精氨酸被半胱氨酸取代(R617C);先证者2的ABCD1基因第560位密码子(位于外显子7)发生了CCG→CTG改变,使原来编码的脯氨酸被亮氨酸取代(P560L);先证者3的ABCD1基因第602位密码子(位于外显子8)发生了AAG→TAG改变,使原来编码的赖氨酸被终止密码子取代(K602X),先证者1、2和3母亲ABCD1基因上一个等位基因上也存在相同的突变。所有无关对照的ABCD1基因编码序列与GenBank登录的参考序列完全一致。

2.2 突变的验证 基因组DNA的第一轮PCR产物及第二轮PCR产物(外显子7~10)经10 g/L的琼脂糖凝胶电泳鉴定,扩增产物长度与预期大小相符(图1)。3位先证者的基因组DNA经第二轮巢式PCR扩增、产物纯化、DNA序列测定后,结果分别证实R617C、P560L和K602X突变位点的存在(图2),先证者1、2和3的母亲分别为R617C、P560L、和K602X突变的携带者。

3 讨论

X-ALD是最常见的过氧化物酶体病,呈进行性发展,发

病后的临床症状较为严重,根据临床表现, Moser 等<sup>[5]</sup>将其分为9型: MRI 正常的无症状型、MRI 异常的无症状型、MRI 正常的单纯 Addison 病型、MRI 异常的单纯 Addison 病型、轻度大脑型、重度大脑型、单纯肾上腺脊髓神经病型、大脑型合并肾上腺脊髓神经病型、小脑型,其中大脑型占 47%~48%,本研究中3个家系的先证者均符合重度大脑型的临床诊断。从基因结构上看,这3位先证者的突变分别位于 ABCD1 基因的第8外显子、第7外显子和第8外显子,均位于 ABCD1 基因 3'端,从 ABCD1 蛋白结构上看,3个突变均位于 ATP 结合区功能结构域。

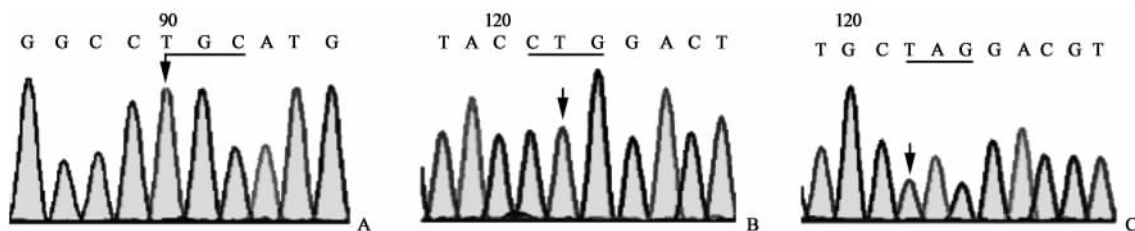


图2 先证者 ABCD1 基因部分测序图

Fig 2 Part of sequencing map in proband's ABCD1 gene

A-C: Proband 1-3, respectively

ABCD1 基因全长约 21 kb,由 10 个外显子和 9 个内含子组成, Kok 等<sup>[6]</sup>发现体内存在和 ABCD1 基因 3'端相似的序列,使用 PCR 技术分析这些区域的突变时,往往会被干扰,因此提出了 ABCD1 假基因这个问题。研究证实 ABCD1 假基因分别位于常染色体 2p11、10p11、16p11 和 22q11 区域,和 ABCD1 基因的第 7 外显子到第 10 外显子区域存在 92%~96% 的序列相似性。因此, Lachtermacher 等<sup>[1]</sup>认为,应用基因组 DNA 进行突变分析时,应选择适当的检测方法,防止假基因干扰 ABCD1 基因 3'端的突变检测。

假基因(pseudogene)是基因组上与编码基因序列非常相似的非功能性基因组 DNA 拷贝,一般情况下,由于假基因缺少有功能的启动子和其他调控元件,大部分不能被转录,且没有明确生理意义<sup>[7]</sup>。因此本研究先从转录水平即 mRNA 水平对 ABCD1 基因进行突变分析,能有效检测出 ABCD1 基因突变位点,然而要从基因组 DNA 途径来验证这些突变位点,需注意排除 ABCD1 假基因的干扰。本研究小组曾经应用 ARMS 法成功地排除了 2 个 X-ALD 家系分子诊断中假基因的干扰<sup>[8-9]</sup>,该方法快速、简便,但对同一种突变需要设计多对 ARMS 引物,且对同一外显子的不同突变亦需要设计不同的引物进行检测,方能作出准确诊断。

为了彻底解决 ABCD1 假基因的干扰问题,我们设计了一对巢式 PCR 外侧引物,扩增上至第 6 外显子,下至 3'非编码区的大片段,确保只扩增 X 染色体上的基因,避免假基因扩增的干扰。根据突变所在的外显子位置,设计相应针对外显子 7~10 的内侧引物,以第一轮 PCR 产物为模板进行第二轮 PCR,再进行 RFLP 或 PCR 产物直接测序,能快速、有效地验证 RT-PCR 途径检测出的突变位点。

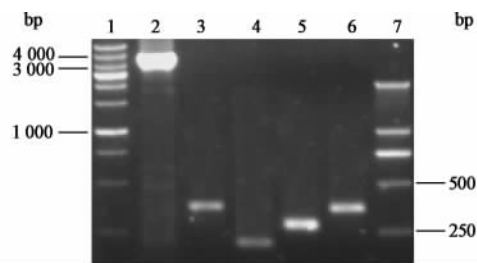


图1 基因组 DNA 的 PCR 产物

Fig 1 Electrophoresis of PCR product of genomic DNA

1,7: DNA molecular weight standard; 2: First round PCR product; 3-6: Second round PCR products of exon 7-10, respectively

#### [参考文献]

- [1] Lachtermacher M B, Seuáñez H N, Moser A B, Moser H W, Smith K D. Determination of 30 X-linked adrenoleukodystrophy mutations, including 15 not previously described[J]. Hum Mutat, 2000, 15: 348-353.
- [2] 兰风华, 李慧忠, 卢爱薇, 郑德柱, 谢飞, 朱忠勇. 长链 RT-PCR 在若干遗传病基因突变分析中的应用[J]. 福建医科大学学报, 2003, 37: 256-259.
- [3] 兰风华, 杨渤生, 吴一波, 卢爱薇, 吴玉水, 黄俏佳, 等. 肾上腺脑白质营养不良的分子诊断(附 2 例报告)[J]. 福建医药杂志, 2003, 25: 39-42.
- [4] Montagna G, Di Biase A, Cappa M, Melone M A, Piantadosi C, Colabianchi D, et al. Identification of seven novel mutations in ABCD1 by a DHPLC-based assay in Italian patients with X-linked adrenoleukodystrophy [J]. Hum Mutat, 2005, 25: 222-227.
- [5] Moser H W, Raymond G V, Dubey P. Adrenoleukodystrophy: new approaches to a neurodegenerative disease. [J]. JAMA, 2005, 294: 3131-3134.
- [6] Kok F, Neumann S, Sarde C O, Zheng S, Wu K H, Wei H M, et al. Mutational analysis of patients with X-linked adrenoleukodystrophy[J]. Hum Mutat, 1995, 6: 104-115.
- [7] 周光金, 余龙, 赵寿元. 人类基因组上的假基因[J]. 生命科学, 2004, 16: 210-214.
- [8] 黄梁浒, 郑德柱, 曾健, 辛娜, 兰风华. 肾上腺脑白质营养不良分子诊断中假基因干扰的排除[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31: 572-575.
- [9] 王志红, 黄梁浒, 兰风华. 应用双侧扩增阻滞突变系统排除肾上腺脑白质营养不良分子诊断中假基因的干扰[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23: 558-560.

[本文编辑] 尹茶